

## بررسی ژنتیکی ۴۵ شجره بزرگ ناشنوایی و تعیین فراوانی جهش های ژن کانکسین ۲۶ (GJB2) در استان چهارمحال و بختیاری

عفت فرخی<sup>۱\*</sup>، دکتر سید ابوالفتح شیرمردی<sup>۲\*</sup>، دکتر ابوالفضل خوشدل<sup>۳\*\*\*</sup>، دکتر سروش امانی<sup>۴†</sup>، مهشید سلیمانی<sup>۵††</sup>، محبوبه کثیری<sup>۶†††</sup>، جهانبخش رهبریان<sup>۷•</sup>، ندا پروین<sup>۸••</sup>، نجمه شاهین فرد<sup>۹•••</sup>، دکتر زهرا نوع پرست<sup>۱۰○</sup>، دکتر علی ضامن صالحی فرد<sup>۱۱○○</sup>، مسعود افضل<sup>۱۲○○○</sup>، محمد امین طباطبایی فر<sup>۱۳•</sup>، منوچهر شیرانی<sup>۱۴♦♦</sup>، دکتر مرتضی هاشم زاده<sup>۱۵♦♦♦</sup>

<sup>۱\*</sup>کارشناس ارشد بیوشیمی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۲\*</sup>پزشک عمومی- سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، <sup>۳\*\*\*</sup>استادیار گروه اطفال- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۴†</sup>پزشک عمومی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۵††</sup>کارشناس ارشد جامعه شناسی- سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، <sup>۶†††</sup>کارشناس پرستاری- سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، <sup>۷•</sup>کارشناس بهداشت عمومی- سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، <sup>۸••</sup>کارشناس ارشد پرستاری- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۹•••</sup>کارشناس مامایی- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۱۰○</sup>متخصص اطفال- سازمان بهزیستی کشور، <sup>۱۱○○</sup>پزشک عمومی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۱۲○○○</sup>کارشناس بهداشت عمومی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۱۳•</sup>دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک انسانی- دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، <sup>۱۴♦♦</sup>کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی زابل، <sup>۱۵♦♦♦</sup>ستاد گروه ژنتیک انسانی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۷/۶ تاریخ تایید: ۱۳۸۷/۱۱/۲۴

### چکیده:

**زمینه و هدف:** ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی - عصبی در انسان می باشد. علیرغم اینکه ژن های مختلفی در ایجاد ناشنوایی نقش دارند اما بیشترین جهش ها در بسیاری از جوامع در ژن کانکسین ۲۶ (GJB2) گزارش شد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژی ژنتیک و فراوانی جهش های ژن GJB2 در ۴۵ شجره بزرگ ناشنوایی استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۷ انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی ژنتیکی، ۴۵ شجره بزرگ ناشنوایی از نظر الگوی توارث، خویشاوندی و تنوع شدت ناشنوایی در بین خواهران و برادران با استفاده از اطلاعات بدست آمده از پرسشنامه ها و ادیوگرام ها بررسی و نوع و فراوانی جهش های ژن GJB2 در ۴۵ پروباند با استفاده از روش تعیین توالی تعیین گردید.

**نتایج:** این مطالعه ۷۳٪ ازدواج خویشاوندی را نشان داد که معمول ترین آن ها ازدواج بین خویشاوندان درجه ۳ با میزان ۴۹٪ بود که عمدتاً بین عموزاده ها دیده شد. الگوی بیماری در ۹۷-۹۴٪ اتوزومال مغلوب و ۶-۳٪ وابسته به X بود. در ارتباط با نتایج آزمایشات مولکولی، جهش های ژن GJB2 در ۱۱٪ جمعیت مورد مطالعه مشخص شد که شامل جهش های 35delG، 167delT، 299-300delAT و 363delC بودند.

**نتیجه گیری:** میزان بالای ازدواج فامیلی دلیل افزایش میزان الگوهای اتوزومی مغلوب بوده و زمینه ساز اصلی تولد افراد ناشنوا می باشد. جهش های ژن GJB2 در ایجاد ناشنوایی در استان چهارمحال و بختیاری دخالت کمی دارد.

**واژه های کلیدی:** اپیدمیولوژی ژنتیک، شجره های ناشنوایی، ژن کانکسین ۲۶، ناشنوایی.

### مقدمه:

به بار می آورد و یکی از اهداف سازمان بهداشت جهانی (WHO) تشویق کشورها به پیشگیری از ناشنوایی در قالب طرح های بین المللی از جمله کاهش

ناشنوایی یک اختلال حسی، عصبی است که بیش از ۱۲۰ میلیون نفر در سراسر دنیا از آن رنج می برند. این اختلال سالانه حدود ۱۵۰ میلیون دلار هزینه

<sup>۱</sup>نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه - دانشگاه علوم پزشکی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- تلفن: ۳۳۴۶۶۹۲-۰۳۸۱، E-mail: mchalesh@yahoo.com

خانوادگی ناشنوایی با متوسط بیش از ۵ ناشنوا در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

### روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی در کل تعداد ۶۴۵ نفر بعنوان عضو شجره نامه های ناشنوایی در قالب ۴۵ شجره بزرگ شامل ۲۳۵ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. جامعه مورد مطالعه کلیه خانواده ها با حداقل ۳ ناشنوا بوده که از طریق هماهنگی با مرکز بهداشت استان چهارمحال و بختیاری و سازمان بهزیستی استان در سال ۱۳۸۷ شناسایی و نمونه گیری به روش آسان انجام شد. از کلیه اعضای خانواده ها و یا والدین افراد زیر ۱۸ سال رضایت نامه کتبی اخذ، پرسشنامه جهت کلیه بیماران هر شجره تکمیل، شجره نامه ترسیم و ادیوگرام تهیه گردید. سپس میزان ۵ میلی لیتر خون از هر پروباند در لوله حاوی EDTA ۰/۵ مولار جمع آوری گردید.

DNA ژنومی تمام نمونه های خون به روش استاندارد فنل - کلروفرم استخراج گردید (۱۱) و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unico 2100 USA) مقدار و کیفیت DNA تخمین زده شد.

ناحیه کد کننده ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از پرایمرهای Forward: 5' CTCCCTGTTCTGTCCTAGCT 3' و Reverse 5' CTCATCCCTCTCATGCTGTGCT3' به طول ۸۰۶ جفت باز که با استفاده از نرم افزار Primer 3، طراحی شدند، به روش PCR تکثیر گردید. شرایط واکنش PCR شامل ۲۲ μl (4mM) MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ μl Taq Polymerase (10X)، ۱۰ μl از هر یک از پرایمرهای Forward (۱۰ PM) و Reverse (۱۰ PM)، ۰/۱ μl dNTP Mix از ۱ μl (5U/μl) Taq DNA Polymerase (10mM) و ۱ μl DNA (حدود ۸۰ng) که در میکروتیوب ریخته و با ddH<sub>2</sub>O به حجم ۲۵ μl رسانده شد. سپس میکروتیوب های محتوی واکنش PCR تحت شرایط دمایی واسرشت اولیه در ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت در ۹۴°C به مدت در ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و طویل سازی نهایی در ۷۲°C به

سن تشخیص و انجام آن در بدو تولد می باشد (۱). شیوع ناشنوایی مادرزادی ۱ در هر ۱۰۰۰ تولد زنده است که بیش از نیمی از این موارد، ژنتیکی است (۲-۴). حدود ۳۰ درصد از موارد ناشنوایی سندرومیک است که شامل صدها سندرمی می شود که ناشنوایی یکی از علائم آن است. ۷۰ درصد دیگر شامل ناشنوایی غیر سندرومیک است. کاهش شنوایی ممکن است قبل از زبان باز کردن (Pre lingual) یا بعد از آن (Post lingual) آغاز شود. کاهش شنوایی غیر سندرومیک مادرزادی حدود ۸۰ درصد اتوزومال مغلوب و حدود ۱۵ درصد اتوزومال غالب، حدود ۳ درصد وابسته به X و حدود ۲ درصد میتوکندریایی است (۵).

تاکنون بیش از ۱۰۰ ژن که در ایجاد ناشنوایی نقش داشته اند شناسایی گردیده اند. در بین این ژنها، جهش در ژن کانکسین ۲۶ (GaP Junction Protein Beta2=GJB2) بیشترین نقش را در ایجاد ناشنوایی اتوزومال مغلوب غیرسندرمی دارد (۶-۸). پروتئین کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده پروتئینی است که در ایجاد انواع اتصالات بین سلولی (Gap junction) نقش دارند. اتصالات بین سلولی، سیستم ارتباطی عمده ای در سلول ها هستند که مسئول تبادل سریع الکترولیت ها، پیامبرهای ثانویه و متابولیت ها در سلول های مجاور هستند (۹،۶). این ژن اولین بار توسط Kelsell و همکاران کشف شد و پس از آن مطالعات بسیار زیادی در ارتباط با اهمیت و نقش جهش های آن در جمعیت های مختلف انجام و نشان داد که در بعضی گروه های قومی علت بیش از ۵۰ درصد ناشنوایی مادرزادی اتوزومی مغلوب می باشد (۶).

در ایران بیشترین جهش در ژن GJB2 در استان گیلان و آذربایجان شرقی با بیش از ۲۷/۵ درصد و کمترین میزان در استان سیستان و بلوچستان با ۳/۶ درصد گزارش گردیده است (۱۰).

این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژی ژنتیک و فراوانی جهش های ژن GJB2 در تعداد ۴۵ شجره بزرگ

مدت ۸ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC PC818-Japan) تکثیر شدند.

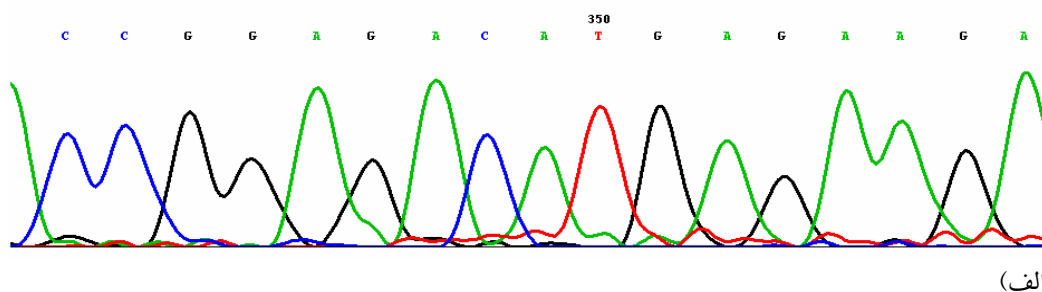
محصولات PCR بدست آمده سپس بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد (Merck Germany) و تحت جریان ۵۰ mA به مدت یک ساعت الکتروفورز شده و سپس توسط رنگ آمیزی نترات نقره رویت شدند تعیین توالی محصولات PCR در خارج از کشور با استفاده از دستگاه ABI (Capillary System) 3730XL انجام شد و نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار کروماس (Chromas) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### یافته ها:

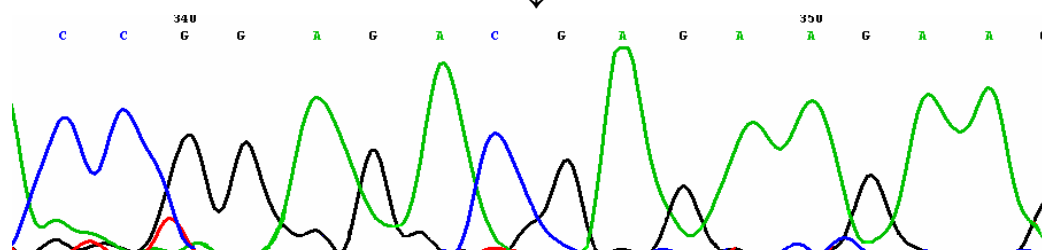
تعداد متوسط جمعیت بیماران در هر شجره شامل  $5/22 \pm 2/78$  نفر با میانگین سنی  $26/96 \pm 10/95$  سال بود. همچنین این مطالعه میزان ۷۳ درصد ازدواج خویشاوندی را نشان داد که شامل ۴۹ درصد بین خویشاوندان درجه ۳، ۱۳ درصد درجه ۴ و ۱۱ درصد درجه ۵ بودند. از طرفی ازدواج های خویشاوندی عمدتاً بین عمو زاده ها (۶۴٪) و به میزان کمتری بین دختر عمه پسر دایی ها یا زاده آنها (۱۵٪)، دختر دایی

پسر عمه ها یا زاده آنها (۱۲٪) و دختر خاله پسر خاله ها یا زاده آنها (۹٪) دیده شد. تنوع زیادی در شدت اختلال شنوایی بین خواهران و برادران هر خانواده مشاهده شد بنحوی که در ۵۷ درصد خانواده ها میزان کاهش شنوایی از خفیف تا عمیق متفاوت بود و در ۴۳ درصد نیز میزان کاهش شنوایی خواهران و برادران در خانواده مشابه بود. در ۱۱ درصد پروباند ها، ناشنوایی از نوع سندرمی بوده و همراه با سایر بیماری ها و اختلالات دیده شد. الگوی توارثی نیز در همه موارد بجز یک خانواده از نوع اتوزومال مغلوب بود. یک خانواده نیز الگوی وابسته به X غالب داشت و یک خانواده هم مشکوک بین اتوزومال مغلوب و وابسته به X مغلوب بود.

در ارتباط با نتایج بررسی جهش های ژن GJB2 در مجموع از ۴۵ نمونه بیمار در ۵ نمونه، جهش در ژن GJB2 (کانکسین ۲۶) مشاهده گردید. این جهش ها شامل یک مورد 35delG، دو مورد 167delT، یک مورد 299-300delAT و یک مورد 363delC بودند. بجز جهش 299-300delAT سایر جهش ها قبلاً از جمعیت ایرانی گزارش شده اند (تصویر شماره ۱).



(الف)



(ب)

تصویر شماره ۱: توالی مربوط به جهش 299-300delAT از ژن کانکسین ۲۶  
(الف) نمونه سالم (ب) نمونه بیمار (هموزیگوت).

**بحث:**

در این مطالعه اپیدمیولوژی ژنتیک، ناشنوایی در ۴۵ شجره بزرگ خانوادگی در استان چهارمحال و بختیاری بررسی شد و عوامل دخیل در ایجاد بیماری نظیر الگوهای وراثتی، نوع و درصد ازدواج های خویشاوندی و انواع ناشنوایی ها از نظر شدت بیماری و سندرومی یا غیر سندرومی بودن مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه الگوی وراثتی شامل ۹۷-۹۴ درصد اتوزومی مغلوب و ۶-۳ درصد وابسته به X مغلوب بدست آمد، در حالی که کاهش شنوایی غیر سندرومی مادرزادی ۸۰ درصد از نوع اتوزومی مغلوب، ۱۵ درصد از نوع اتوزومی غالب، ۳ درصد وابسته به X و ۲ درصد میتو کندریایی می باشد (۵). بنظر می رسد فراوانی بیشتر الگوی اتوزومی مغلوب در این مطالعه بخاطر وقوع بالای ازدواج فامیلی در استان چهارمحال و بختیاری و بخصوص در بین ناشنوایان باشد. فراوانی ازدواج های فامیلی در جامعه مورد مطالعه ما حدود ۷۳ درصد بوده است که با میانگین فراوانی کشوری (۷۱٪) که قبلاً توسط Hashemzadeh و همکاران برای ۸۹۰ خانواده ناشنوا در ۱۰ استان کشور گزارش شده است مطابقت دارد (۱۰). در هر حال در بین ناشنوایان علاقه و تمایل به ازدواج های درون خانوادگی و درون گروهی بخصوص ازدواج ناشنوا با ناشنوا خیلی بیشتر از جامعه معمول است که همه این عوامل منجر به افزایش چشمگیر الگوی اتوزومی مغلوب در جامعه مورد مطالعه شده است. از طرفی فراوانی ازدواج های فامیلی در جامعه مورد مطالعه (۷۳٪) خیلی بیشتر از میزان درصد مربوط به جامعه نرمال کشور (۳۸/۶-۳۷/۳٪) می باشد (۱۲، ۱۳). هر چند فراوانی ازدواج های فامیلی در کشور های پیشرفته و صنعتی خیلی پایین تر از کشور ماست و بعنوان مثال در فرانسه، آمریکا و انگلستان حدود ۲ درصد می باشد. ولی در کشورهای عربی و همسایه در حد نسبتاً بالایی قرار دارد و مثلاً در سوریه ۲۸ درصد، لبنان ۲۵ درصد، پاکستان ۵۰-۴۰ درصد و کویت ۵۴ درصد می باشد (۱۴). نکته جالب دیگر اینکه در جمعیت مورد

مطالعه ازدواج های خویشاوندی عمدتاً بین عموزاده ها (۶۴٪) بوقوع پیوسته که می تواند ناشی از حاکمیت پدر در خانواده ها باشد در حالی که ازدواج های دختردایی پسرعمه یا دخترخاله پسرخاله احتمالاً حاکمیت بیشتر مادر در خانواده را نشان می دهد. در این مطالعه همچنین در حدود ۱۱ درصد پروباند های ناشنوایی از نوع سندرومی بوده و به همراه یک اختلال دیگر نظیر عقب ماندگی ذهنی، شب کوری و صرع دیده شد که در مقایسه با فراوانی ناشنوایی (سندرومی ۳۰٪) توسط دیگران کمتر می باشد (۵). از طرفی تنوع زیادی در شدت اختلال ناشنوایی هم بین خانواده های مختلف و هم بین خواهران و برادران در هر خانواده (۵۷٪) مشاهده شد که احتمالاً می تواند بدلیل تنوع ژنی و یا تنوع آللی در ایجاد ناشنوایی در جامعه مورد مطالعه باشد. نتایج حاصل از بررسی مولکولی ژن GJB2 منجر به تشخیص حدود ۱۱ درصد جهش های مختلف ژن مزبور گردید. از این میان جهش 299-300delAT برای اولین بار در ایران گزارش می شود ولی سایر جهش های به دست آمده در این مطالعه قبلاً به عنوان جهش های بیمارزا گزارش شده اند (۱۰). با توجه به شیب کاهش فراوانی جهش های ژن GJB2 از شمال غرب (۲۷/۵٪) به جنوب شرق (۳/۶٪) کشور، فراوانی جهش های GJB2 یافت شده در این مطالعه دور از انتظار نبوده است، ولی جهش های بدست آمده بسیار متنوع بوده که احتمالاً بیانگر این است که این جامعه یک جامعه بسته سنتی نبوده بلکه در معاشرت و تعامل با سایر جوامع و مذاهب از جمله مسیحی و کلیمی بوده است و وجود جهش 167delT (که جهش بسیار شایع بین جمعیت یهودیان اشکنازی است) در بین جهش های یافت شده این ادعا را تقویت می کند (۱۵).

**نتیجه گیری:**

این مطالعه نشان داد که زمینه اصلی تولد افراد ناشنوا از طریق ازدواج های خویشاوندی و درون

بیماری های اتوزومی مغلوب نیز جداً احتراز شود. هر چند جهش های ژن GJB2 در استان چهارمحال و بختیاری (۱۱٪) نقش چشمگیری همانند شمال کشور (۲۷/۵٪) در ایجاد ناشنوایی ندارند ولی تاکنون بعنوان ژنی که بیشترین نقش را در ایجاد ناشنوایی در استان دارد مطرح می باشد. بنظر می رسد که ژنها و لوکوس های متعدد دیگری در ایجاد ناشنوایی در استان نقش داشته باشند که مطالعات وسیع تری را می طلبد.

### تشکر و قدردانی:

از کلیه بیماران و خانواده های آنها که در این مطالعه شرکت کردند، ریاست و پرسنل محترم سازمان بهزیستی، ریاست و پرسنل محترم آموزش و پرورش استثنایی و ریاست و پرسنل محترم مرکز بهداشت استان که در تهیه لیست ناشنوایان استان و جمع آوری نمونه ها مساعدت کرده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی گردد. این تحقیق از طریق گرنت شماره ۵۳۴ مورخ ۱۳۸۶/۱۲/۲۸ طرح تحقیقاتی مشترک سازمان بهزیستی استان و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تامین و حمایت شده است.

گروهی هموار می شود و به همین دلیل قسمت عمده الگوهای وراثتی ناشنوایی در استان چهارمحال و بختیاری (۹۷-۹۴٪) از نوع اتوزومی مغلوب بوده است. بر اساس نتایج این مطالعه و تحقیقات انجام شده در کشور بطور متوسط بیش از ۷۰ درصد ناشنوایان ثمره ازدواج های فامیلی اند به همین لحاظ مشاوره ژنتیک فعال و اعمال مقررات بازدارنده و فرهنگ سازی جهت کاهش و منع ازدواج های خویشاوندی بسیار موثر خواهد بود. از طرفی کنترل تعداد موالید در خانواده های ناشنوا از موارد دیگر فرهنگ سازی و مشاوره ژنتیک است. ازدواج های درون گروهی در مناطق روستایی و جمعیت های کوچک و بسته از عوامل اصلی دیگر افزایش هموزیگوتی و بروز بیماری های ژنتیکی از جمله ناشنوایی می باشد، بطوری که در مطالعه ما حدود ۲۷ درصد پروباند ها فاقد والدین خویشاوند بودند ولی بدلیل ذکر شده در بالا حامل آلل های موتانت بوده و فرزندان بیمار دنیا آوردند و لذا توصیه می شود از ازدواج های درون گروهی بخصوص در روستاهای کوچک و گروه های جمعیتی کوچک با سابقه

### منابع:

1. Emery AE, Rimondini DL. Principles and practice of medical genetics. Scotland: Edinburgh; 2003. p: 20.
2. Fraser GR. The genetics of congenital deafness. Otolaryngol Clin North Am. 1971 Jun; 4(2): 227-47.
3. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann N Y Acad Sci. 1991; 630: 16-31.
4. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiology studies of early-onset deafness in the U.S. school- age population. Am J Med Genet. 1993 Jun; 46(5): 486-91.
5. Curtler N, Lalwani AK. Etiology of syndromic and non-syndromic sensorineural hearing loss. Otolaryngol Clin North Am; 2002; 35(4): 891-908.
6. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. Nature. 1998 Aug; 394(6694): 630-1.
7. Cohn ES, Kelley PM. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. Am J Med Genet. 1999 Sep; 89(3): 130-6.
8. Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and deafness Homepage. World Wide Web URL: <http://www.crg.es/deafness>.

9. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)*. 1995 Feb; 191(2): 101-18.
10. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: review of gene mutations. *Iranian J Pub Health*. 2007; 36(1): 1-14.
11. Dale JW, Schantz MV. Purification and separation of nucleic acid In: Dale JW, Schantz MV. *From Genes to genomes*. Chichester: John Wiley; 2002. p: 31-3.
12. Farhud DD, Kamali MS, Marzban M, Andonian L, Saffari R. Consanguinity in Iran. *Iranian J Pub Health*. 1991; 20: 1-14.
13. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud DD. Consanguineous marriage in Iran. *Ann Hum Biol*. 2004 Mar-Apr; 31(2): 263-9.
14. Turnpenny PD, Ellard S. Emery's: elements of medical genetics. 12<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier's. 2005; 267.
15. Sobe T, Erlich P, Berry A, Korostichevsky M, Vreugde S, Avraham KB, et al. High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin 26 (GJB2) gene in Israeli Ashkenazim. *Am J Med Genet*. 1999 Oct; 86(5): 499-500.

